dr hab. Agnieszka Niedziela, prof. IHAR-PIB
Zakład Biochemii i Biotechnologii
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB
Radzików
05-870 Błonie

Radzików, dn. 14.05.2024r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Eryki Milarskiej
pt. „Genetyczna charakterystyka wybranych alpejskich i arktyczno-alpejskich gatunków z rodzaju *Cerastium* L. (*Caryophyllaceae*)"
wykonanej w Katedrze Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod kierunkiem naukowym dr hab. Piotra Androsiuka

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej z dnia 18.04.2024r. (WBiB-DZ.RND.26.2024), z prośbą o jej wykonanie.

Struktura pracy – ocena formalna

Rozprawę stanowi spójny tematycznie zbiór dwóch wieloautorskich artykułów naukowych opublikowanych w 2023 roku w uznanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym:

1. Milarska SE, Androsiuk P, Bednarek PT, Larson K, Giełwanowska I. 2023. Genetic variation of *Cerastium alpinum* L. from Babia Góra, a critically endangered species in Poland. Journal of Applied Genetics 64: 37-53. DOI: 10.1007/s13353-022-00731-x
2. Milarska SE, Androsiuk P, Paukszto Ł, Jastrzębski JP, Maździarz M, Larson K, Giełwanowska I. 2023. Complete chloroplast genomes of *Cerastium alpinum, C. arcticum* and *C. nigrescens*: genome structures, comparative and phylogenetic analysis. Scientific Reports 13: 18774. DOI: 10.1038/s41598-023-46017-y

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, IF) prac w roku opublikowania wynosi 7.00, a łączna liczba punktów MEiN to 280. W obu artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem a jej udział w powstaniu publikacji był wiodący i polegał na: genotypowaniu materiałów badawczych analizie i interpretacji wyników genotypowania *C. alpinum*, wizualizacji danych oraz charakterystyce i analizach porównawczych genomów chloroplastowych. Ponadto Doktorantka przygotowała pierwsze wersje manuskryptów i udzieliła odpowiedzi na recenzje obu prac.
Poza kopiami artykułów naukowych, które stanowią oceniane osiągnięcie naukowe w skład rozprawy wchodzi streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp zawierający informacje dotyczące przedmiotu rozprawy, opis hipotez badawczych i celu pracy, przedstawienie materiałów i metod zastosowanych w badaniach, omówienie uzyskanych wyników zawartych w poszczególnych publikacjach, podsumowanie, bibliografia oraz spis tabel. Na końcu opracowania załączono oświadczenia współautorów określające ich wkład w przygotowanie publikacji. Oświadczenia te, wraz z „Authors contribution" zamieszczonymi w obu pracach potwierdzają, iż Pani mgr Sylwia Eryka Milarska pełniła istotną rolę w powstaniu obu publikacji. Zaproponowany przez Autorkę układ pracy nie budzi moich zastrzeżeń podobnie jak przyjęty przez nią tytuł pracy, który jest zwięzły i zgodny z zaprezentowanymi w publikacjach wynikami badań.

Wartość merytoryczna pracy

W ostatnich dziesięcioleciach obserwuje się postępujące ograniczenie występowania siedlisk wielu gatunków roślin spowodowane przede wszystkim ekspansją rolnictwa na nienaruszone jeszcze ekosystemy, rozprzestrzenianiem się gatunków inwazyjnych oraz postępującymi zmianami klimatu

wynikającymi z działalności człowieka. Prowadzi to do nieodwracalnej utraty bioróżnorodności będącej zagrożeniem prawidłowego funkcjonowania życia na Ziemi. Jednym z gatunków skategoryzowanych w Polskiej Czerwonej Księdze Roślin jako krytycznie zagrożony jest *Cerastium alpinum*, w Polsce znane pod nazwą rogownica alpejska. Jego jedyne naturalne stanowiska znajdują się na niewielkim obszarze Babiej Góry. Brak jest danych literaturowych informujących o aktualnej kondycji genetycznej w obrębie tej populacji, które mogłyby ułatwić zaplanowanie skutecznej strategii ochrony tego gatunku. Również wiedza na temat relacji filogenetycznych w obrębie rodzaju *Cerastium* a przede wszystkim kompleksu *C. alpinum – C. arcticum* jest bardzo ograniczona ze względu na brak uniwersalnych markerów do identyfikacji poszczególnych taksonów. Nie ma więc wątpliwości, że podjęty przez Doktorantkę temat badawczy jest oryginalny a prezentowane wyniki dostarczają nowych danych.

We **wstępie** Doktorantka w wyczerpujący sposób opisuje aktualny stan wiedzy dotyczący tematyki pracy omawiając w pierwszej kolejności przyczyny oraz skutki utraty zmienności genetycznej w obrębie populacji. Następnie przedstawia techniki molekularne użyte dotychczas w badaniach zmienności genetycznej wybranych gatunków z rodzaju *Cerastium* oraz zalety systemu markerów iPBS (ang. inter primer binding sites). Dogłębnie opisuje też problem systematyki gatunków omawianego rodzaju a na koniec wspomina o niewielkiej dostępności sekwencji genomów chloroplastowych przedstawicieli rodziny *Caryophyllaceae*.

Na podstawie przeglądu badań empirycznych innych autorów Doktorantka określa problem badawczy, a następnie stawia **cele** i formułuje własne **hipotezy badawcze**. W mojej ocenie przyjęte hipotezy badawcze korespondują z celami pracy. Cel pierwszy: „Analiza zmienności genetycznej *C. alpinum* z obszaru Babiej Góry" został sformułowany poprawnie. Uważam jednak, że cel drugi: „Uzyskanie danych umożliwiających identyfikację oraz analizę powiązań filogenetycznych pomiędzy gatunkami kompleksu *C. alpinum – C. arcticum*" niezbyt trafnie odzwierciedla intencje Autorki. Czy rzeczywiście głównym celem było samo uzyskanie danych, czy raczej identyfikacja oraz analiza powiązań na podstawie uzyskanych danych? Nie jest do końca zrozumiałe, jakie dane Doktorantka ma na myśli.

Rozdział **Materiały i metody** został przygotowany w sposób właściwy i uporządkowany. Zawiera opisy użytych materiałów roślinnych wraz z ich pochodzeniem i dokładną lokalizacją, wykaz metod badawczych oraz sposób analizowania wyników. Zakres stosowanych metod analitycznych jest właściwie dobrany do założonych celów badawczych. Zadaniem Doktorantki była między innymi izolacja genomowego i chloroplastowego DNA, określenie jego ilości i czystości, wykonanie analiz PCR z użyciem starterów iPBS z zastosowaniem metodyki opracowanej wcześniej przez Kalendar i in. (2010) z modyfikacjami Androsiuka i in. (2015) oraz przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania na platformie Illumina NovaSeq6000. Moje duże uznanie dla Doktorantki budzi znajomość szeregu specjalistycznych programów komputerowych bez których analiza danych molekularnych byłaby niemożliwa. Należą do nich zarówno programy używane w badaniach z zakresu genetyki populacji tj.: GenAlEx v.6.5, PAST, Arlequin v.3.5, Bottleneck v.1.2.02, Structure v.2.3.4, Structure Harvester v.0.6.94, jak również programy służące do kontroli jakości odczytów i adnotacji genomu (FastQC, Geneious v.R7), PlasMapper), generowania map (OrganellarGenome DRAW), analiz powtórzeń genomowych i sekwencji mikrosatelitarnych (REPuter, Phobos v.3.3.12) oraz częstości występowania poszczególnych kodonów (Geneious v.R7), identyfikacji substytucji (DnaSP v.6.10.04) i miejsc edycji RNA (PREPACT 3.0). Ponadto do analiz filogenetycznych i określenia zróżnicowania genetycznego Pani Sylwia Eryka Milarska posłużyła się programami komputerowymi MAFFT v.7.310, Mega v.7, MrBayes v.3.2.6, DnaSP v.6.10.04 i MAUVE v.1.1.1.

Niestety w tej części opisu Autorka nie ustrzegła się przed popełnieniem rażącego błędu myląc pojęcia hodowli i uprawy roślin (punkt 4.4 rozprawy doktorskiej). Nie sprecyzowała też z jakiej części rośliny pobierano materiał do izolacji DNA. Czy próba do analiz NGS pochodziła z jednej czy z kilku roślin?

W kolejnym rozdziale Pani Sylwia Eryka Milarska omawia **wyniki badań,** na podstawie których przygotowano publikacje stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej.

W **Publikacji I** Autorka ocenia skuteczność markerów iPBS wnioskując, że system ten jest skuteczny zarówno w ujawnianiu polimorfizmu genetycznego pomiędzy osobnikami z poszczególnych populacji,

jak i pomiędzy analizowanymi populacjami. Za pomocą analizy PCoA wskazuje na wysokie podobieństwo pomiędzy populacjami 1-4 zasiedlającymi rejon Babiej Góry oraz pomiędzy populacjami 5 (Szwajcaria) i 7 (Szwecja). Populacja 6 (Norwegia – rejon Arktyki) okazała się genetycznie najbardziej oddalona od pozostałych. Analiza struktury genetycznej z wykorzystaniem statystyki bayesowskiej potwierdziła odrębne grupowanie materiałów pozyskanych ze stanowisk w Szwajcarii, Szwecji i Norwegii oraz wskazała na ich genetyczną jednorodność. Populacja babiogórska była podzielona na kilka odrębnych grup, jednakże wartości Q wskazywały na przypisanie części materiału roślinnego do więcej niż jednej z nich. W opisie Autorka nie podaje niestety podstawowych parametrów analizy bayesowskiej takich jak: wartości deltaK, liczba potencjalnych grup, oraz odsetek roślin częściowo lub jednoznacznie przypisanych do każdej z nich. Relacje pomiędzy analizowanymi populacjami *C. alpinum* określone zostały także za pomocą wskaźnika utrwalenia alleli w populacjach (FST). Wskaźnik ten potwierdził największe zróżnicowanie genetyczne pomiędzy populacjami 5 oraz 6 (0.839) i najmniejsze pomiędzy populacjami babiogórskimi (0.268-0.538). Doktorantka wskazuje na istotną i pozytywną korelację ($R2 = 0.5073$, $p = 0.02$) pomiędzy wartością dystansu genetycznego między populacjami a odległością geograficzną pomiędzy nimi.

Za najważniejsze osiągniecie wykazane w **Publikacji II** należy uznać zsekwencjonowanie genomów chloroplastowych trzech gatunków z rodzaju Cerastium: *C. alpinum*, *C. arcticum* i *C. nigrescens*. Uzyskane sekwencje zdeponowano w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information). Kolejnym cennym wynikiem jest szczegółowa charakterystyka uzyskanych genomów chloroplastowych ze wskazaniem różnic, na podstawie których można wnioskować o odrębności poszczególnych gatunków. Do analiz włączono dostępne w bazie NCBI sekwencje genomów chloroplastowych *C. glomeratum* i *C. arvense*. W obrębie badanych genomów Doktorantka zidentyfikowała 113 genów, w tym 79 genów kodujących białka, 30 genów kodujących tRNA oraz cztery geny kodujące rRNA. Dominującym aminokwasem była leucyna (10.7%), a najliczniej występującym kodonem ATT (4.46%). Analiza wykazała obecność 79 powtarzalnych sekwencji o długości od 30 do 170 pz. Najwięcej z nich, w liczbie 23, obserwowano u *C. arcticum*. Ponadto Doktorantka odnotowała również obecność od 20 (*C. nigrescens*) do 23 (*C. arcticum*) sekwencji mikrosatelitarnych. Zauważyła, że badane genomy wyraźnie różnią się pod względem ilości występowania motywów mono-, di-, tri- i tetranukleotydowych tego typu sekwencji. Co istotne, występuje też unikalny motyw dinukleotydowy AT/TA w genomie chloroplastowym *C. glomeratum* oraz pentanukleotydowy (AATAT/TATAA) i heksanukleotydowy (AAATCC/CCTAAA) w genomie *C. alpinum*. Kolejnym ważnym zadaniem, którego podjęła się Doktorantka było przeanalizowanie presji selekcyjnej oddziałującej na sekwencje kodujące białka w 77 genomach chloroplastowych badanych gatunków. Na podstawie stosunku częstości występowania substytucji niesynonimicznych (Ka) do synonimicznych (Ks) Pani Sylwia Eryka Milarska wykazała, że w przypadku badanych gatunków dominuje selekcja negatywna (czyszcząca), z wyjątkiem genu kodującego chloroplastową dehydrogenazę NADH (ndhB). Z punktu widzenia identyfikacji potencjalnych markerów molekularnych odpowiednich do analiz filogenetycznych i poprawnego rozpoznania gatunków, bardzo ważnym wynikiem było wykazanie obecności dziewięciu wysoce zmiennych ($\pi > 0.015$) regionów niekodujących genomu chloroplastowego, wśród których największą wartość π (0.02708) zaobserwowano dla regionu trnD-GUC–trnY-GUA. Ponadto Autorka zidentyfikowała i opisała potencjalne miejsca edycji w 63 genach kodujących białka w genomach chloroplastów C. *alpinum*, *C. arcticum* i *C. nigrescens*. Dopełnieniem badań była rekonstrukcja powiązań filogenetycznych w ramach rodzaju *Cerastium* oraz rodziny *Caryophyllaceae* zakończona wnikliwą analizą potencjalnej ścieżki różnicowania taksonów w toku ewolucji.

Podsumowując, wysoko oceniam wartość merytoryczną artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, że prace te zostały wcześniej poddane wnikliwej i rygorystycznej recenzji specjalistów a także edytorów naukowych i uzyskały ich pozytywne opinie. W związku z tym omawianie ich strony edytorskiej uważam za zbędne.

Moje uwagi dotyczą opisu wyników Publikacji I w autoreferacie. Zabrakło tu krótkiego, jednozdaniowego wprowadzenia, które informowałoby czytelnika o przeznaczeniu poszczególnych

wskaźników opisujących relacje w obrębie badanych populacji. Przykładem jest zastosowanie do tych celów współczynnika FST. Autorka podaje największą i najmniejszą wartość FST, ale nie wyjaśnia znaczenia tego parametru, zakresu jego wartości oraz sposobu interpretacji uzyskanego wyniku w przyjętej skali (Wright 1978). Ułatwieniem dla czytelnika byłoby również umieszczenie w tym miejscu ryciny obrazującej wyniki, przykładowo w postaci dendrogramu. Ponadto Doktorantka często stosuje bardzo ogólne opisy nie wskazując wartości liczbowych wyników, np. „Najwyższe wartości obu parametrów stwierdzono dla populacji 3, podczas gdy najniższe dla populacji 5"; „Wykorzystanie programu Bottleneck pozwoliło na wykrycie śladów efektu wąskiego gardła u wszystkich badanych populacji"; „Badania prowadzone z wykorzystaniem programu Structure wykazały wyraźną strukturę genetyczną w badanym materiale" Wyniki stanowiące podstawę napisania Publikacji II zostały zaprezentowane bez zastrzeżeń - zwięźle, a jednocześnie szczegółowo. Sugeruję jedynie unikanie mieszania w opisie formy osobowej z bezosobową, np. „zgodnie z naszymi obserwacjami" vs. „obserwowano".

Opracowanie autoreferatu zakończone jest **podsumowaniem** stanowiącym reasumpcję wyników badań i obejmującym trzynaście punktów. Ich treść precyzyjnie odnosi się do stawianych hipotez badawczych. W mojej opinii hipotezy te zostały w pełni zweryfikowane w wyniku przeprowadzonego eksperymentu badawczego. Warto byłoby jednak w tym miejscu podkreślić, jakie znaczenie mają przeprowadzone badania oraz w jaki sposób wyniki pracy mogą wpłynąć na dalszy rozwój dziedziny.

Wybór piśmiennictwa jest adekwatny i dobrze dobrany na potrzeby przygotowania rozprawy doktorskiej. Liczba cytowanych publikacji (52) świadczy o dobrej znajomości tematyki podjętych badań. Większość pozycji bibliograficznych (96%) stanowią prace anglojęzyczne o zasięgu międzynarodowym, w tym 38% z nich zostało opublikowane w ostatniej dekadzie. Spis literatury został przygotowany z dużą starannością.

Pragnę podkreślić, że wyżej wymienione uwagi i sugestie, które pojawiły się w ocenianej rozprawie doktorskiej nie umniejszają jej wysokiej wartości merytorycznej. Proszę jednak o ustosunkowanie się do nich i omówienie podczas publicznej obrony. Ponadto proszę o odniesienie się do następujących pytań:

1. Najmniejsza z badanych populacji liczyła jedynie 14 osobników, a największa 28. Jakie jest ryzyko błędu podczas szacowania dystansu genetycznego z użyciem markerów DNA w obrębie tak małej próby?
2. Jaka jest minimalna efektywna wielkość populacji pozwalająca uniknąć jej wyginięcia w wyniku depresji chowu wsobnego i jak na tym tle przedstawia się kondycja populacji babiogórskiej?
3. Czy Doktorantka mogłaby scharakteryzować działania jakie należałoby podjąć, aby na podstawie otrzymanych wyników sekwencjonowania uzyskać prosty w użyciu marker do celów identyfikacji gatunków z rodzaju *Cerastium*?

Podsumowanie oceny pracy

Podsumowując recenzję stwierdzam, że Doktorantka wykazała się obszerną wiedzą z zakresu przedmiotu badań, znajomością najnowszej literatury oraz samodzielnością w rozwiązywaniu oryginalnego problemu naukowego. Struktura pracy i jej układ są zgodne z wymaganiami stawianymi pisaniu prac doktorskich. Eksperymenty doświadczalne zostały zaplanowane i przeprowadzone w sposób prawidłowy. Autorka udowodniła, że nie tylko potrafi biegle posługiwać się licznymi programami do analizy danych molekularnych i korzystać z informacji zgromadzonych w internetowych bazach danych, ale również umiejętnie interpretować uzyskane wyniki. W mojej opinii przeprowadzone badania są nowatorskie i dostarczają cennych informacji dotyczących poziomu zmienności genetycznej w obrębie jedynego w Polsce stanowiska występowania *C. alpinum* oraz budowy genomów chloroplastowych wybranych gatunków z rodzaju *Cerastium*. Mają one nie tylko charakter poznawczy, ale i aplikacyjny ponieważ znalezione różnice w sekwencji genomów chloroplastowych *C. alpinum, C. arcticum, C. nigrescens, C. arvense* i *C. glomeratum* mogą posłużyć

do jednoznacznej identyfikacji wymienionych gatunków oraz stanowią podstawę do opracowania markerów molekularnych do tego celu. Przeprowadzone badania dostarczają również cennych informacji niezbędnych do opracowania skutecznej strategii ochrony zasobów genetycznych populacji babiogórskiej *C. alpinum*. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można sądzić, że Doktorantka zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej. Na uwagę zasługuje fakt, że zgodnie z informacją zamieszczoną na stronie Web of Science Core Collection w skład dorobku naukowego Pani mgr Sylwii Eryki Milarskiej oprócz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wchodzą cztery inne publikacje, gdzie Doktorantka pełni rolę pierwszego autora lub współautora. Dorobek ten jest częściowo wynikiem współpracy zarówno z krajowymi jak i zagranicznymi placówkami naukowymi.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska zatytułowana „Genetyczna charakterystyka wybranych alpejskich i arktyczno-alpejskich gatunków z rodzaju *Cerastium* L. (*Caryophyllaceae*)" reprezentuje wysoki poziom naukowy i stanowi wartościowy wkład w rozwój dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, w ramach których Pani mgr Sylwia Eryka Milarska ubiega się o stopień doktora.

W związku z powyższym ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Eryki Milarskiej **spełnia wymogi formalne określone art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023.742 z późniejszymi zmianami).** Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie rozprawy i **dopuszczenie Pani mgr Sylwii Eryki Milarskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**

dr hab. Agnieszka Niedziela, prof. IHAR-PIB